动 物 学 研 究 2012，Oct. 33(5): 481−486 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.05481

花鲈 Wap65-2 基因的克隆、理化性质及其表达与哈维氏弧菌感染的相关性

史雨红，陈 炯*，高姗姗，沈广强，陆新江，李明云

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室，浙江 宁波 315211)

摘要：Wap65-2 (warm temperature acclimation related 65 kDa protein-2)是鱼类中发现的一种血浆糖蛋白，与细菌感染性免疫应激紧密相关。该研究首次克隆了花鲈 Wap65-2 基因全长 cDNA 序列。它由 1 601 个核苷酸组成，包含一个大的开放阅读框，预期编码一个由 436 个氨基酸组成、相对分子质量为 4.87×10^4 的前体蛋白，N 端 19 个残基为信号肽序列。序列和系统进化树分析表明，花鲈 Wap65-2 与欧洲海鲈进化关系最近，两者氨基酸同源性高达 80.7%。健康花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 主要在肝中表达，心和肌肉中少量表达。qRT-PCR 分析揭示，哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染感染 12 h 后，花鲈肝中 Wap65-2 基因 mRNA 表达显著上调，24 h 时达到峰值，为健康对照的 6.89 倍。原核表达花鲈 Wap65-2 并制备抗血清。Western blot 分析表明，哈维氏弧菌感染 12 h 后，花鲈血清中 Wap65-2 含量显著增加，36 h 时达到最大值，为健康对照的 5.33 倍。综上所述，花鲈 Wap65-2 基因的表达与其细菌感染性免疫应激紧密相关。

关键词：Wap65-2 基因；花鲈；哈维氏弧菌；实时荧光定量 PCR；Western blot
中图分类号：Q959.483; Q344.13 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)05-0481-06

Cloning, physical and chemical property analysis of the Japanese sea bass Wap65-2 gene and its expression following *Vibrio harveyi* infection

SHI Yu-Hong, CHEN Jiong*, GAO Shan-Shan, SHEN Guang-Qiang, LU Xin-Jiang, LI Ming-Yun

(*Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology*, *Ministry of Education*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315211, *China*)

Abstract: The warm temperature acclimation related 65 kDa protein-2 (Wap65-2), a teleost plasma glycoprotein, plays an important role in immune regulation against bacterial infection. Here, for the first time we determined the full length cDNA sequence of the Japanese sea bass Wap65-2 gene (1601 bp in length excluding the 3'-polyA tail). The sequence contains an open reading frame that encodes a protein of 436 amino acids with a molecular weight of 4.87×10^4. The predicted protein had a signal peptide in the N-terminal domain containing 19 residues. Sequence comparison and phylogenetic tree analysis showed that the Japanese sea bass Wap65-2 has a relatively high similarity to the *Dicentrarchus labrax* Wap65-2. In the healthy Japanese sea bass, Wap65-2 mRNA was expressed mainly in the liver and weakly in the heart and muscle. qRT-PCR results revealed that liver Wap65-2 transcripts were significantly increased after a *Vibrio harveyi* infection, and peaked 24 hour post injection (6.89 fold increase). The Japanese sea bass Wap65-2 protein was expressed in *Escherichia coli* and subsequently used for antiserum preparation. Western blot analysis showed that Wap65-2 was significantly increased in *V. harveyi* infected Japanese sea bass and reached a maximum of 5.33-fold increase at 36 h. In conclusion, the alteration of Japanese sea bass Wap65-2 expression was tightly associated with the progression of the *V. harveyi* bacterial infection.

Key words: Wap65-2; *Lateolabrax japonicus*; *Vibrio Harveyi*; qRT-PCR; Western blot

Wap65s (warm temperature acclimation related 65 kDa protein)是鱼类中发现的一类血浆糖蛋白，

收稿日期：2012-04-19；接受日期：2012-08-21
基金项目：教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0928)；浙江省自然科学基金(Y3110053)；宁波市自然科学基金(2010A610006)；中央财政支持地方高校发展专项（xkc11005）
*通信作者(Corresponding author)，Tel: 0574-87609571, E-mail: jchen1975@163.com
第一作者简介：史雨红(1979−)，女，浙江富阳人，讲师，研究方向为水产分子免疫学；Tel: 13484273300; E-mail: shiyuhong0517@163.com

因其与暖温适应相关且相对分子质量为 6.5×10^4 而得名。该类蛋白存在 Wap65-1 和 Wap65-2 两种异构体(Hirayama et al, 2003)。研究表明, Wap65-2 具有多种生物学功能, 它与鱼类暖温适应(Hirayama et al, 2003)、重金属胁迫(Aliza et al, 2008)和生长发育(Hirayama et al, 2004)等紧密相关。近年来, Wap65-2 在细菌感染性免疫应激中的作用日益引起人们的关注(Cho et al, 2012; Li et al, 2011; Peatman et al, 2008; Sha et al, 2008; Shi et al, 2010)。目前, 多种鱼类 Wap65-2 基因序列已被克隆, 包括东方红鳍鲀(*Takifugu rubripes*) (Hirayama et al, 2003)、青鳉(*Oryzias latipes*) (Hirayama et al, 2004)、蓝鲇(*Ictalurus furcatus*) (Peatman et al, 2008)、斑点叉尾鮰(*I. punctatus*) (Sha et al, 2008)、剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*) (Aliza et al, 2008)、真裸南极鱼(*Harpagifer antarcticus*) (Clak & Burns, 2008)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*) (Shi et al, 2010)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*) (Sarropoulou et al, 2010)和大鳞泥鳅(*Misgurnus mizolepis*) (Cho et al, 2012)。

花鲈(*Lateolabrax japonicus*, Japanese sea bass)俗称鲈鱼、七星鲈, 属鲈形目鮨科花鲈属, 是东北亚特有种、分类学代表种, 具有广温性和广盐性特点, 是我国重要的海水养殖对象之一。随着海水网箱养殖规模的不断扩大、集约化程度的不断提高、养殖环境污染等诸多因素的影响, 花鲈网箱养殖的细菌性病害发生频繁且给产业造成了巨大的危害(Wang et al, 2002)。抗生素为代表的传统治疗方法易产生抗药性和药残等原因, 已逐渐被禁用和取代。免疫学是研究生物体对抗原物质免疫应答性及其方法的学科, 是有效防治各类病害的基础, 也是水产动物的研究热点之一。本文拟通过克隆花鲈 Wap65-2 基因 cDNA 全序列, 明确了其序列特征、系统进化关系及 mRNA 的组织表达特征, 随后原核表达制备了抗血清, 并分别采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 技术研究了花鲈肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 和血清 Wap65-2 蛋白的表达与哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染的相关性, 为进一步深入研究 Wap65-2 在鱼类细菌性免疫中的分子作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

健康花鲈体重约 70~80 g, 体长约 15~22 cm, 购自宁波象山港养殖场。大肠杆菌 TG1、BL21 plysE 菌株和原核表达载体 pET-28a 由本实验室保存。RNAiso 试剂、SMART RACE cDNA amplification kit、*Ex Taq* DNA 聚合酶、DNA Ligation Kit Ver.2.0、SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒均购自 Takara 公司; Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司; 引物由上海英俊生物技术有限公司合成; 肽 N-糖苷酶 F (PNGase F)购自 New England Biolabs 公司; 二抗 (辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG) 购自北京中山金桥生物技术有限公司; ECL 化学发光试剂盒、显影定影试剂盒购自碧云天生物技术研究所; ICR 小鼠购自宁波大学医学院实验动物中心。哈维氏弧菌 Mm001 分离株来自鮸鱼 (Shi et al, 2012); 其他常规化学药剂均为国产分析纯。

1.2 样品制备

健康花鲈分为感染组和对照组, 共 35 尾, 实验组每尾花鲈腹腔注射 100 μL (3.8×10^6 CFU)哈维氏弧菌 PBS 悬液, 对照组每尾花鲈注射同体积无菌 PBS。注射后 12 h, 随机挑选感染组花鲈 3 尾进行病原菌分离, 确认接种效果(Li et al, 2009)。感染组和对照组花鲈分别于注射后 12、24、36 和 48 h 取样, 每次 4 尾/组, 其中尾静脉抽取的血液于 4 ℃静置 4 h 析出血清, 离心后血清保存于−70 ℃。

1.3 花鲈 Wap65-2 cDNA 序列的获得

提取健康花鲈肝组织总 RNA, 总 RNA 经电泳检测和紫外分光光度计纯度分析。用 SMART RACE cDNA amplification kit 合成肝 cDNA, 具体方法参照厂家说明书。根据数据库中已知的东方红鳍鲀、青鳉、蓝鲇、斑点叉尾鮰、剑尾鱼、真裸南极鱼、香鱼以及欧洲海鲈 Wap65-2 保守结构域设计兼并引物 Wap65-2-3t (+): 5'-CGCTGGCTVGAGCACTAYTACTG-3', V = A, G, or C, Y=T, C, 与试剂盒自带引物 Nested Universal Primer A(5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3')配对以肝 cDNA 为模板进行聚合酶链式反应(PCR)获得 3'-端部分序列; 随后根据 3'-端部分序列设计特异引物 Wap65-2-5t (-): 5'-TAATTGCGGGCATCCTTTGG-3', 与 Nested Universal Primer A 配对扩增获得 5'-端部分序列。测序由上海华大基因科技有限公司完成, 序列拼接获得花鲈 Wap65-2 基因全长 cDNA 序列。信号肽序列预测采用 SignalP 4.0 程序 (http://www.cbs.dtu.dk/ services/ SignalP/)。系统进化树构建采用 MEGA 5.0 软件(Tamura et al, 2011), N-糖基化位点预测采用 NetNGlyc

程序(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)。

1.4　花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 的组织表达特征分析

根据已获得的花鲈 Wap65-2 基因 cDNA 序列设计特异引物 jWap65-2 (+)：5'-CCCCATCGAGCACGGTATTGT-3'和 jWap65-2 (-)：5'-CATGGCGGGGGTGTTGAAGGT-3', 预期扩增片段长度为 129 bp。根据花鲈看家基因β-actin cDNA 序列 (HE577671) 设计引物 jActin (+)：5'-CCCCATCGAGCACGGTATTGT-3' 和 jActin (-)：5'-CATGGCGGGGGTGTTGAAGGT -3', 预期扩增片段长度为 190 bp。采用 RNAiso 试剂提取 3 尾健康花鲈各组织总 RNA, DNase I 处理、第一链 cDNA 合成和 PCR 扩增等方法同文献 (Huang et al, 2011)。

1.5　哈维氏弧菌感染的花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达定量分析

抽提哈维氏弧菌感染不同时段的花鲈肝总 RNA, DNase I 处理后合成第一链 cDNA, 以其为模板, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测 Wap65-2 基因和β-actin 基因 mRNA 的表达变化, 引物对分别为 jWap65-2 (+)/jWap65-2(-)和 jActin(+)/jActin(-)。每组 4 个样品, 每个样品技术重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 Wap65-2 基因 mRNA 的相对表达量 (Livak & Schmittgen, 2001)。

1.6　花鲈 Wap65-2 基因的原核表达和抗血清制备

设计花鲈 Wap65-2 基因原核表达扩增引物 pjWap65-2(+):5'-GGAATTCCATATGGCACCTGCGGCGCCACAAGA-3'和 pjWap65-2(-): 5'-GGAATTCTTAATCCTGACATCCCATCAT-3', 下划线为 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切位点序列, 其预期编码蛋白为 Wap65-2 去除信号肽的成熟蛋白部分。以 cDNA 为模板 PCR 扩增获得目的片段, 扩增产物经 1% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 QIAquick Gel Extraction 纯化。重组表达质粒 pET-28a-jWap65-2 构建、IPTG 诱导表达和抗血清制备等方法同文献 (Huang et al, 2011)。

1.7　蛋白质 Western blot 分析

花鲈血清蛋白样品处理、SDS 分离、转膜和 ECL 化学发光检测等方法同文献 (Huang et al, 2011)。一抗为所制备的小鼠抗花鲈 Wap65-2 抗血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG。

1.8　蛋白糖基化检测

根据糖苷酶试剂盒说明, 取血清蛋白 9 μL (约 20 μg), 变性后用 PNGase F 酶切处理, 蛋白质印迹检测 Wap65-2 (Kong et al, 2012)。

1.9　数据分析

qRT-PCR 和 Western blot 分析实验结果表示为平均值±标准误差, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计分析(SPSS 软件), 其中 $P<0.05$ 为显著差异。

2　结　果

2.1　花鲈 Wap65-2 基因 cDNA 序列分析

采用 RACE 技术分别获得花鲈 Wap65-2 基因 3'端序列和 5'端序列, 其重叠区域为 104 bp, 根据这段序列将两段序列拼接后获得一段包含完整开放阅读框的 cDNA 序列。该序列由 1 601 个核苷酸组成 (EMBL 登录号：FR828804), 3'-末端具有 poly (A) 尾。序列包含一个大的开放阅读框, 起始于第 32~34 位的 ATG 起始密码子, 终止于第 1 340~1 342 位的 TGA 终止密码子, 预测编码一个由 436 个氨基酸组成、相对分子质量为 4.87×10^4 的前体蛋白。前体蛋白 N 端 19 个氨基酸为信号肽序列, 成熟蛋白由 417 个氨基酸组成, 相对分子质量为 4.68×10^4。鱼类 Wap65-2 与血红素结合蛋白在结构上有一定的相似性 (Hirayama et al, 2003), 血红素结合蛋白的血红素口袋区内一般有 8 个保守芳香氨基酸残基和 2 个保守组氨酸, 而鱼类 Wap65-2 蛋白则具有其中 7 个芳香氨基酸残基和 2 个组氨酸。在花鲈中, 这些氨基酸残基分别为：Trp207、Tyr212、Phe219、Tyr233、Tyr240、Tyr241、Trp301、His249、His293。NetNGlyc 程序预测揭示, 花鲈 Wap65-2 氨基酸序列中存在 3 个可能的 N-糖基化位点, 分别为 Asn79、Asn124 和 Asn208。

序列比对表明, 花鲈 Wap65-2 与欧洲海鲈 Wap65-2 氨基酸序列同源性最高, 达 80.7%, 与其它鱼类 Wap65-2 同源性为 59.5%~75.5 %。基于全长氨基酸序列的系统进化树构建中, 花鲈 Wap65-2 与欧洲海鲈和真裸南极鱼的 Wap65-2 紧密成簇 (图 1)。

2.2　花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 的组织表达特征

花鲈基因组 DNA 经 DNase I 处理后, 进行 Wap65-2 和β-actin 基因 PCR 扩增, 未发现扩增条带, 说明处理后的基因组 DNA 不会对扩增结果产生干扰(图 2)。健康花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 主要在肝中表达, 在心和肌肉中也有少量表达, 其他组织未观察到肉眼可见条带(图 2)。

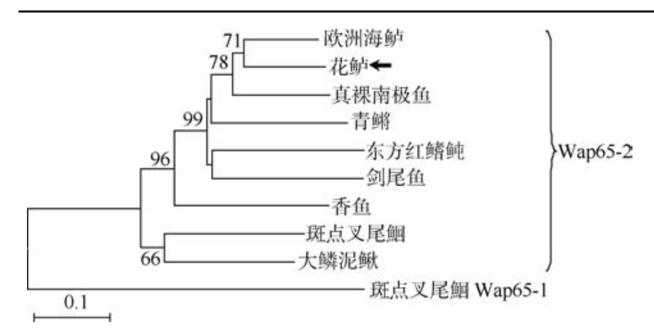


图 1 基于 NJ 法构建花鲈和其它鱼类全长 Wap65-2 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Wap65-2 gene sequences from the Japanese sea bass (Black arrow) and other fish based on the NJ method

外群为斑点叉尾鮰 Wap65-1(EU030383)。分叉处数值表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度, 只显示置信度 60%以上的数值; 标尺长度表明每个位点发生 0.1 次置换。鱼类 Wap65s 序列登录号为: 斑点叉尾鮰 Wap65-1(EU030383)、欧洲海鲈 (BK006867)、花鲈 (FR828804)、真裸南极鱼 (AM408054)、青鳉 (AB195241)、东方红鳍鲀 (NM_001032589)、剑尾鱼 (DQ388969)、香鱼 (AM999340)、斑点叉尾鮰(EU030384)和大鳞泥鳅 (JN230715)。

Ictalurus punctatus Wap65-1 (EU030383) was used as the outgroup. The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1 000 replicates; shown only when >60%). Accession numbers of the Fish Wap65 sequences used are: *Ictalurus punctatus* Wap65-1, EU030383; *Dicentrarchus labrax*, BK006867; *Lateolabrax japonicus,* FR828804; *Harpagifer antarcticus*, AM408054; *Oryzias latipes,* AB195241; *Takifugu rubripes*, NM_001032589; *Xiphophorus hellerii*, DQ388969; *Plecoglossus altivelis*, AM999340; *Ictalurus punctatus*, EU030384; *Misgurnus mizolepis,* JN230715.

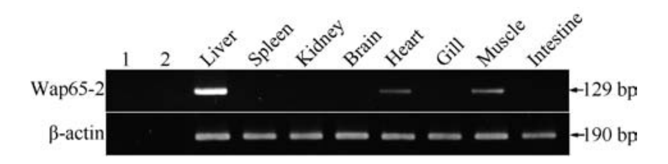


图 2 花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 的组织表达特征

Fig. 2 The mRNA expression patterns of Wap65-2 in various tissues of the healthy Japanese sea bass

1: 花鲈基因组 DNA (DNase I 处理); 2: 无模板阴性对照。

1: Japanese sea bass genomic DNA used as template (DNase I digested); 2: Without template, used as negative control.

2.3 与哈维氏弧菌感染相关的花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达变化

哈维氏弧菌感染后 12、24、36 和 48 h 时, qRT-PCR 分析花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 的表达变化。结果表明, 与健康对照组相比, 12 h 时, 感病花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 表达量无显著变化; 24 h 时, 表达量显著增加, 约为对照 6.89 倍; 36 h, 表达量为对照 6.23 倍; 48 h 时, 表达量又恢复至健康对照水平(图 3)。

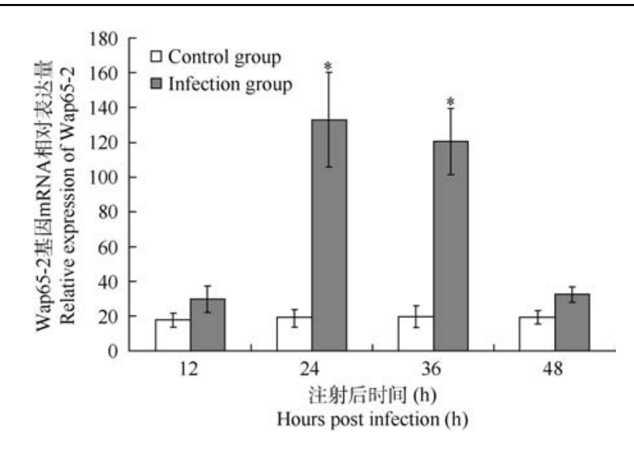


图 3 哈维氏弧菌感染前后花鲈肝组织中 Wap65-2 基因 mRNA 表达变化

Fig. 3 Analysis of liver Wap65-2 mRNA expression changes following a *V. harveyi* infection in the Japanese sea bass

*显著性差异(Indicates a significant difference) (n=4, P<0.05)。

2.4 花鲈 Wap65-2 的原核表达及血清中成熟蛋白的 N-糖基化分析

重组质粒 pET-28a-jWap65-2 经测序表明, 插入片段开读框正确且与已获得的花鲈 Wap65-2 基因核苷酸序列同源性为 100%。重组质粒转化大肠杆菌 BL21 plysS 并经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测表明在相对分子质量 4.9×10^4 处出现一条高浓度的诱导表达条带, 与计算机推测的融合蛋白(花鲈 Wap65-2-His-tag)相对分子质量大小 (4.68×10^4+0.20×10^4) 一致 (图 4)。将该片段切胶纯化后免疫小鼠, 制备抗血清。

Western blot 结果表明, 花鲈血清 Wap65-2 成熟蛋白分子质量约为 6.5×10^4, 比计算值大 1.8×10^4 左右, 经 PNGase F 处理后, 血清 Wap65-2 成熟蛋白分子质量变为 4.7×10^4, 与计算值基本吻合, 揭示 Wap65-2 存在翻译后 N-糖基化修饰 (图 4), 其糖链含量，占总相对分子质量的 28.1%。

2.5 与哈维氏弧菌感染相关的花鲈血清 Wap65-2 蛋白水平变化

分别取 12、24、36 和 48 h 花鲈血清进行 Western blot 分析。与健康对照组相比, 12 h 时, 哈维氏弧菌感染的花鲈血清 Wap65-2 含量无显著变化; 24 h 时, 含量显著增加; 36 h 时含量达到峰值, 为对照含量的 5.33 倍, 48 h 时, 含量回落, 但仍显著高于对照含量 (图 5)。

3 讨 论

Wap65-2 基因目前仅在鱼类中报道。本文首次

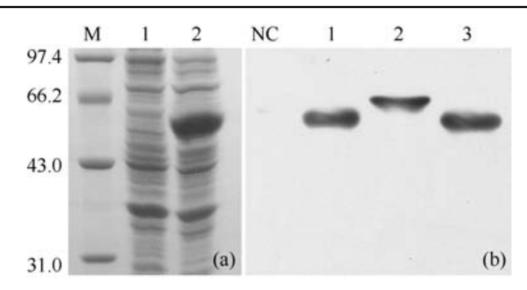


图 4 花鲈 Wap65-2 基因的原核表达 (a) 和血清中成熟肽的糖基化 (b) 验证

Fig. 4 Prokaryotic expression (a) and the confirmation of their posttranslational N-glycosylation (b) of Japanese sea bass Wap65-2

a) SDS-PAGE 检测花鲈 Wap65-2 基因的原核表达产物, 考马斯亮蓝 G-250 染色。M：低相对分子质量标准蛋白质 ($\times10^3$); 1：转化有 pET-28a 质粒的 BL21 plys E, IPTG 诱导; 2：转化有 pET-28a-jWap65-2 重组质粒的 BL21 plys E; b) Western blot 分析验证花鲈血清中 Wap65-2 蛋白的 N-糖基化, ECL 显影。NC：空白阴性对照; 1：原核表达产物; 2：花鲈血清, 未经 PNGase F 处理; 3：花鲈血清, 经 PNGase F 处理。

a) SDS-PAGE analysis of prokaryotically expressed Japanese sea bass Wap65-2; stained by Coomassie brilliant blue G-250. M: protein molecular weight standards ($\times10^3$); 1: *pET-28a* (+)-transformed BL21 plys E, induced by IPTG; 2: *pET-28a-jWap65-2* transformed BL21 plys E, induced by IPTG. b) The confirmation of posttranslational N-glycosylation of Wap65-2 by Western blot, visualized by HRP conjugated-ECL. NC: Negative control; 1: recombinant Wap65-2 produced in *E. coli*; 2. Japanese sea bass serum, not digested by PNGase F; 3: Japanese sea bass serum, digested by PNGase F.

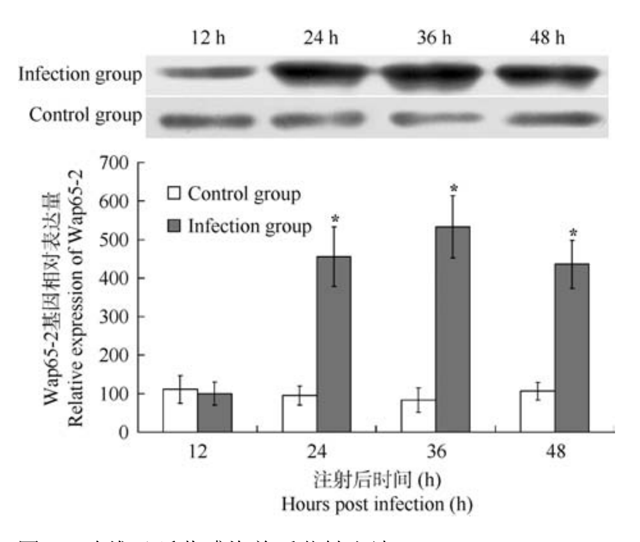


图 5 哈维氏弧菌感染前后花鲈血清 Wap65-2 Western blot 检测

Fig. 5 Western blot analysis of Wap65-2 from Japanese sea bass serum infected with *V. harveyi*

a：各时段花鲈血清 Wap65-2 Western 条带; b：Western 条带灰度值分析。*：显著性差异 (n=4, P<0.05)

a: Western blot of Japanese sea bass serum from respective time periods; b: pray value analysis of Western blot. *: significant difference (n=4, P<0.05)

克隆了花鲈 Wap65-2 基因全长 cDNA 序列。预测编码蛋白具有鱼类 Wap65-2 的典型结构特征, 具有保守的 7 个疏水残基和 2 个组氨酸残基, 这都与血红素结合区的形成有关。序列分析表明，它与欧洲海鲈 Wap65-2 最相似, 氨基酸序列同源性高达 80.7%。组织表达特征分析表明, 花鲈 Wap65-2 基因 mRNA 主要在肝组织中表达, 这与其它鱼类已报道结果吻合(Cho et al, 2012; Clak & Burns, 2008; Hirayama et al, 2003, 2004; Sha et al, 2008; Shi et al, 2010)。花鲈 Wap65-2 糖基，占蛋白总相对分子质量的 28.1%。

文献揭示, Wap65-2 与鱼类细菌性免疫紧密相关。例如, 人工感染鮰爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)后, 斑点叉尾鮰肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达显著上调 5 倍 (Sha et al, 2008), 蓝鲇肝组织中 Wap65-2 基因 mRNA 表达量也上调 12.5 倍 (Peatman et al, 2008); 人工感染鳗利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 12 h 后, 香鱼肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达上调 2 倍, 其它组织表达无明显变化(Shi et al, 2010); 大鳞泥鳅在注射 LPS 后, 肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达量上调 6 倍, 人工感染迟钝爱德华氏菌 (*E. tarda*) 24 h 后, 肝组织中 Wap65-2 基因 mRNA 表达量上调 15 倍, 并且至注射后 96 h 持续高表达 (Cho et al, 2012)。而青鳉注射 LPS 以及欧洲海鲈注射鳗利斯顿氏菌后, 肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 的表达无明显变化, 这可能与物种差异有关 (Hirayama et al, 2004; Sarropoulou et al, 2010)。本文结果表明, 花鲈肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达变化与哈维氏弧菌感染时程紧密相关, 12 h 后开始表达增加, 24 h 时表达达到峰值, 48 h 时, 表达恢复至健康对照水平。同时, 本文对花鲈血清 Wap65-2 蛋白含量也做了相应分析, 结果表明, 其变化趋势与肝 Wap65-2 基因 mRNA 表达趋势基本一致, 区别在于 48 h 时, 血清 Wap65-2 含量仍维持在较高水平, 而肝组织 Wap65-2 基因 mRNA 表达已回复至健康对照水平, 这与香鱼受鳗利斯顿氏菌感染后血清 Wap65-2 含量变化的趋势吻合 (Li et al, 2011)。关于 Wap65-2 参与鱼类细菌性免疫反应的机制目前尚不明确, 但我们的前期研究揭示, 香鱼 Wap65-2 和补体 C3 间存在特异性相互作用(Shi et al, 2011), 揭示 Wap65-2 可能与鱼类补体激活有关。

综上所述, 本研究首次报道了花鲈 Wap65-2 基因表达与哈维氏弧菌感染时程紧密相关, 为鱼类 Wap65-2 的结构、功能和作用机制的深入研究奠定了基础。

参考文献：

Aliza D, Ismail IS, Kuah MK, Shu-Chien AC, Muhammad TST. 2008. Identification of Wap65, a human homologue of hemopexin as a copper-inducible gene in swordtail fish, *Xiphophorus helleri* [J]. *Fish Physiol Biochem,* **34**(2): 129-138.

Cho YS, Kim BS, Kim DS, Nam YK. 2012. Modulation of warm-temperature-acclimation-associated 65-kDa protein genes (Wap65-1 and Wap65-2) in mud loach (*Misgurnus mizolepis*, Cypriniformes) liver in response to different stimulatory treatments [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **32**(5): 662-669.

Clark MS, Burns G. 2008. Characterisation of the warm acclimated protein gene (wap65) in the Antarctic plunderfish (*Harpagifer antarcticus*) [J]. *DNA Seq,* **19**(1): 50-55.

Hirayama M, Kobiyama A, Kinoshita S, Watabe S. 2004. The occurrence of two types of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme [J]. *J Exp Biol,* **207**(8): 1387-1398.

Hirayama M, Nakaniwa M, Ikeda D, Hirazawa N, Otaka T, Mitsuboshi T, Shirasu K, Watabe S. 2003. Primary structures and gene organizations of two types of Wap65 from the pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. *Fish Physiol Biochem,* **29**(3): 211-224.

Huang ZA, Chen J, Lu XJ, Shi YH, Li MY. 2011. Alteration on the expression of ayu coagulation factor X gene upon *Listonella anguillarum* infection [J]. *Zool Res,* **32**(5): 492-498. [黄左安, 陈炯, 陆新江, 史雨红, 李明云. 2011. 香鱼凝血因子 X 基因表达与鳗利斯顿氏菌感染的相关性. 动物学研究, **32**(5): 492-498.]

Kong CJ, Huang ZA, Chen J, Shi YH, Lu XJ. 2012. Molecular cloning, sequence analysis and expression of ayu complement component C9 gene [J]. *Zool Res,* **33**(2): 151-157. [孔铖将, 黄左安, 陈炯, 史雨红, 陆新江. 2012. 香鱼补体成分 C9 基因的克隆、序列分析及表达. 动物学研究, **33**(2): 151-157.]

Li CH, Chen J, Shi YH, Li MY. 2009. Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China [J]. *Acta Microbiol Sin,* **49**(7): 931-937. [李长红, 陈炯, 史雨红, 李明云. 2009. 宁海地区香鱼弧菌病病原菌鉴定. 微生物学报, **49**(7): 931-937.]

Li CH, Chen J, Shi YH, Lu XJ. 2011. Use of suppressive subtractive hybridization to identify differentially expressed genes in ayu (*Plecoglossus altivelis*) associated with *Listonella anguillarum* infection [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **31**(3): 500-506.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}{}_{T}$ method [J]. *Methods,* **25**(4): 402-408.

Peatman E, Terhune J, Baoprasertkul P, Xu P, Nandi S, Wang SL, Somridhivej B, Kucuktas H, Li P, Dunham R, Liu ZJ. 2008. Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Mol Immunol,* **45**(2): 553-566.

Sarropoulou E, Fernandes JM, Mitter K, Magoulas A, Mulero V, Sepulcre MP, Figueras A, Novoa B, Kotoulas G. 2010. Evolution of a multifunctional gene: the warm temperature acclimation protein Wap65 in the European seabass *Dicentrarchus labrax* [J]. *Mol Phylogenet Evol,* **55**(2): 640-649.

Sha ZX, Xu P, Takano T, Liu H, Terhune J, Liu ZJ. 2008. The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacteria infections [J]. *Mol Immunol,* **45**(5): 1458-1469.

Shi YH, Chen J, Li CH, Li MY. 2010. Molecular cloning of liver Wap65 cDNA in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes following *Listonella anguillarum* infection [J]. *Mol Biol Rep,* **37**(3): 1523-1529.

Shi YH, Chen J, Li CH, Yang HY, Lu XJ. 2011. The establishment of a library screening method based on yeast two-hybrid system and its use to determine the potential interactions of liver proteins in ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. *Fish Shellfish Immunol,* **30**(4-5): 1184-1187.

Shi YH, Chen J, Chang HL, Lu XJ, Zhang DM, Li HY, Zhao ZX, Li MY. 2012. Detection of bacterial pathogens in aquaculture samples by DNA microarray analysis [J]. *Aquaculture,* **338-341**: 29-35.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Bio Evol,* 28(10): 2731-2739.

Wang BK, Yu JH, Li Y, Ji SW, Xu HS. 2002. Isolation and identification of pathogen (*Vibrio harveyi*) from sea perch, *Lateolabrax japonicus* [J]. *J Fish Sci Chn,* **9**(1): 52-55. [王保坤, 余俊红, 李筠, 纪伟尚, 徐怀恕. 2002. 花鲈弧菌病病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, **9**(1): 52-55.]

宁波大学海洋学院海洋生物技术研究团队简介

宁波大学海洋学院海洋生物技术研究团队成立于 2007 年，目前有教授 3 人，副教授 4 人，具有博士学位研究人员 9 人。主要研究方向包括海洋生物基因资源和活性物质的研究与开发，主要研究领域涉及动物行为学、病理学、分子免疫学和海洋药物学等。团队先后主持国家及省部级科研项目 20 余项，得到国家 973 前期专项、国家 863 计划、国家自然科学基金、浙江省科技厅重大项目和教育部博士点基金等的资助，总经费达 1000 余万元。目前课题组已在国内外学术刊物上发表论文 80 余篇，其中 SCI 收录论文 30 余篇。

陈 炯

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)